

Mejoramiento genético tradicional y empleo de técnicas biotecnológicas en la búsqueda de resistencia frente a los principales patógenos fúngicos de *Musa* spp.

Michel Leiva-Mora

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: michel@ibp.co.cu

RESUMEN

Los bananos y plátanos son componentes importantes de la dieta humana ya sea como alimento cocido o como fruta fresca. Las enfermedades causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) y *Mycosphaerella fijiensis* han amenazado la desaparición de los mismos. Estos cultivos son difíciles de mejorar genéticamente debido a que son estériles, no producen semillas y la mayoría son partenocárpicos. Sin embargo, el empleo de los cruzamientos genéticos mediante las técnicas de hibridación, han sido alternativas exitosas en los programas de la FHIA y el IITA, los cuales han puesto en manos de productores numerosos híbridos mejorados frente a dichas enfermedades. Por otra parte, la Biotecnología vegetal ha desarrollado un conjunto de técnicas para la micropropagación de *Musa* spp. que han permitido aumentar la tasa de multiplicación, disponer de material vegetal sano (libre de plagas y enfermedades) y homogéneo, adecuado para realizar la plantación. Las técnicas mutagénicas, el uso de la variación somaclonal, la embriogénesis somática y más recientemente el empleo de técnicas de transformación genética, han permitido avanzar y complementarse con el mejoramiento genético clásico de *Musa* para la búsqueda de genotipos resistentes frente a las principales enfermedades fúngicas. Los sistemas de evaluación en condiciones de campo de la resistencia de genotipos de *Musa* spp. frente a Foc y *M. fijiensis* han demostrado ser útiles aunque laboriosos. Para aumentar la eficiencia en la selección de genotipos promisorios, se requiere del desarrollo de metodologías de evaluación temprana reproducibles ya sea utilizando el patógeno o sus derivados.

Palabras clave: evaluación y selección, *Fusarium oxysporum*, *Musa* improvement, *Mycosphaerella fijiensis*, programas de hibridación

ABSTRACT

Bananas and plantain are important food staple in human diet, even cooked or consumed fresh. Fungal diseases caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) and *Mycosphaerella fijiensis* have threatened to destroy *Musa* spp. Those crops are difficult to breed genetically because they are sterile, do not produce fertile seeds and they are parthenocarpic. Genetic crossing by hybridization have been used successfully in FHIA and IITA *Musa* breeding programs, they have released numerous improved hybrids to those diseases. Plant Biotechnology has developed a set of techniques for *Musa* micropropagation to increase multiplication rates, healthy and safety plant material for plantation. Mutagenic techniques, somaclonal variation, somatic embryogenesis and more recent genetic transformation have enabled advances and complementation with classical *Musa* breeding for searching resistance to principal fungal pathogen of *Musa* spp. Field evaluation systems to find *Musa* resistant genotypes to Foc and *M. fijiensis* have demonstrated to be useful but laborious. Nevertheless to enhance efficacy in selection of promissory genotypes the development of reproducible early evaluation methodologies by using fungal pathogens or their derivatives is needed.

Key words: evaluation and selection, *Fusarium oxysporum*, hybridization programs, *Mycosphaerella fijiensis*, *Musa* improvement

Generalidades del cultivo de Bananos y Plátanos

Los bananos y plátanos son fuentes de alimento tanto para consumidores de sectores rurales como urbanos. Son producidos en las zonas tropicales húmedas y constituyen una importante fuente de ingresos para campesinos y pequeños productores. Se cultivan en más de 100 países de las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Sharrock y Frison, 1999) y para su cultivo son utilizadas más de 10 millones de hectáreas (Marín *et al.*, 2003).

Origen y distribución

Los bananos y plátanos se originaron en el sureste de Asia y las Islas del Pacífico (De Langhe, 1996; Robinson, 1996; Jones, 2000). El cruzamiento natural de varios diploides no comestibles de *Musa acuminata* durante muchos años dio como resultado híbridos partenocárpicos, con esterilidad femenina, fruto comestible y triploides en su estructura genómica. Estos diploides y triploides seleccionados de *Musa acuminata* fueron

trasladados a áreas más secas donde otros diploides silvestres de *Musa balbisiana* se desarrollaron naturalmente y de este modo ocurrieron hibridaciones interespecíficas entre *Musa* (Genoma A) y *Musa* (Genoma B) (Robinson, 1996).

Importancia alimentaria, económica y social de *Musa* spp.

Los bananos y plátanos son componentes importantes de la dieta humana en casi todos los países del mundo, ya sea como alimento cocido o como fruta fresca (Marín *et al.*, 2002). Como alimento, proporciona carbohidratos, posee bajo contenido de sodio, y es la fuente más rica de potasio y vitamina B₆ lista para consumir (Chandler, 1995; Kodyn y Zapata, 1999).

La producción anual de bananos y plátanos a nivel mundial supera los 76 millones de toneladas y la exportación de estos es clave para la economía de muchos países en desarrollo (Marín *et al.*, 2003).

En América Latina y el Caribe los bananos y plátanos aportan más de un tercio de la producción mundial (aproximadamente 30 millones de toneladas métricas por año) y contribuyen con un 83% de los bananos para exportación. Estos tienen especial importancia socioeconómica para la región, dado que aquí se encuentran cuatro de los cinco mayores productores de banano del mundo: Ecuador, Costa Rica, Colombia y Panamá aunque constituyen únicamente el 30% de la producción regional. Casi un 70% de los bananos y plátanos producidos en América Latina y el Caribe son para consumo local. Brasil es el mayor productor, con un rendimiento aproximado de 6 millones de toneladas anuales, de las cuales menos del 1% se destina a la exportación. El plátano (*Musa* spp. AAB) en particular, forma parte importante de la seguridad alimenticia de la región.

Este cultivo es importante desde el punto de vista social debido a que proporciona empleo a miles de personas, sin tener en cuenta las actividades referentes al transporte, seguros y comercio en el mundo entero, lo que da lugar a ingresos adicionales que suman miles de dólares (Swennen *et al.*, 1995).

Principales enfermedades fúngicas de *Musa*

Los bananos y plátanos están expuestos a enfermedades, plagas y al agotamiento de los nutrientes del suelo (Mobambo, 2002). Las enfermedades han afectado seriamente la industria dedicada a la producción y la exportación de estos cultivos. Entre ellas se encuentran el Mal de Panamá causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Jain, 2002; Marín *et al.*, 2003; Bhagwat y Duncan, 2006) y las manchas foliares de las hojas causadas por varias especies de *Mycosphaerella* (Mourichon y Fullerton, 1990; Carlier *et al.*, 2000).

Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense

El marchitamiento por *Fusarium* (también conocido como Mal de Panamá), es ocasionado por un hongo del suelo: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), que por primera vez fue reconocido en 1876 en Brisbane (Australia) afectando el cultivar 'Sugar' (Silk/Pisang Rasthali, AAB). En 1910 luego de grandes esfuerzos se logró aislar y caracterizar al agente causal a partir de tejidos enfermos procedentes de Cuba (Smith, 1910). En la década de los años 50, del siglo XX, la enfermedad había alcanzado tales proporciones epidémicas, que fue considerada como una de las enfermedades de las plantas más destructivas en la historia de la agricultura. La infección ocurre cuando el patógeno penetra en las raíces de la planta de banano. Luego el hongo invade los vasos del xilema y puede avanzar hacia el cormo y parte del pseudotallo, si no es bloqueado por las respuestas de oclusión vascular del hospedante.

La importancia del marchitamiento por Foc, a nivel global, decreció en el Nuevo mundo luego de que los cultivares del subgrupo Cavendish reemplazaran en los mercados de exportación a sus antecesores susceptibles. Este patógeno aun es la principal limitante en la producción de cultivares como: 'Silk' (AAB) 'Apple' 'Mah' y 'Manzano' en Brasil, Costa Rica, Cuba, Perú, EEUU (Florida), Venezuela y otros muchos países del hemisferio occidental. De igual modo otros cultivares también han sido afectados por dicho patógeno como son: 'Gros Michel' (AAA), 'Pome', AAB, 'Bluggoe' (ABB) ('Burro', 'Chato'), y menos extendido en 'FHIA-03' (AABB), 'FHIA-18' (AAAB), 'FHIA-23' (AAAA), 'Hua Moa' (AAB), 'Maqueño' (AAB), y 'Pisang awak' (ABB). Dentro de los cultivares diploides el 'Ney poovan' (AB), ya no se puede producir comercialmente debido a lo ampliamente distribuida que está la raza 1 de Foc. Actualmente la raza 4 es de gran interés a nivel global y en especial en el hemisferio occidental debido a que la exportación está basada fundamentalmente en el cultivo de cultivares del subgrupo Cavendish, así como de algunos plátanos AAB y otros cultivares susceptibles.

Mediante la implementación de estrictas medidas de control cuarentenarias, sugeridas por el *International Plant Genetic Resources Interchange* (IPGRI) a través de las guías técnicas creadas al efecto para la transferencia del germoplasma sano, se espera que esta nueva raza de Foc quede confinada solamente al continente asiático.

Manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* spp.

Dentro de los patógenos fúngicos que causan manchas foliares en los bananos; *Mycosphaerella*

musicola (Anamorfo: *Pseudocercospora musae*) causante de la enfermedad Sigatoka amarilla, *Mycosphaerella fijiensis* (Anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis*) causante de la enfermedad de la raya negra de la hoja (Sigatoka negra) y *Mycosphaerella eumusae* (Anamorfo: *Pseudocercospora eumusae*) se caracterizan por producir síntomas muy similares en las hojas infectadas, por lo que algunos autores lo denominan el complejo Sigatoka (Jones, 2000; Crous y Mourichon, 2002). Todos ellos producen serios daños económicos. Debido a la similitud de los síntomas causados por *M. musicola*, *M. fijiensis* y *M. eumusae*, se ha sugerido que las enfermedades causadas por estos tres hongos se denominen manchas foliares causado por el complejo Sigatoka (Jones, 2003).

Los bananos y plátanos generalmente se siembran en pequeñas parcelas y la mayoría de los agricultores no pueden asumir grandes gastos en la adquisición de productos químicos para el control de plagas y enfermedades en la protección fitosanitaria. Debido a la devastadora enfermedad Sigatoka negra, existe una creciente demanda de nuevas variedades, especialmente de aquellas que han tenido buen rendimiento con resistencia incorporada, que no impliquen cambios en los sistemas de cultivos y manejos agrotécnicos de campesinos y pequeños productores.

Técnicas de la Biotecnología vegetal en apoyo al mejoramiento genético de *Musa*

Las técnicas de micropropagación están bien establecidas y consolidadas en *Musa* (Cronauer y Krikorian, 1984; Banerjee de Langhe, 1985; Vuylsteke, 1989). Algunos laboratorios de cultivo de tejidos han resuelto necesidades de las plantaciones de bananos para la exportación a través de las mismas (Smith y Drew, 1990). El cultivo de tejidos es simple, fácil y aplicable a un gran número de genotipos de *Musa* (Vuylsteke, 1989). La formación de yemas se efectúa mediante el cultivo de ápices en medios de cultivo estándares que contienen 2-5 mg.l⁻¹ de citoquininas (principalmente 6-bencilaminopurina) o mediante la fragmentación de ápices. Las tasas de multiplicación pueden variar de dos a diez brotes o propágulos por mes lo que resulta en un potencial de propagación de varios miles o millones de plantas por año. Tales índices son muy superiores a los que se ejecutan en la agricultura mediante la propagación tradicional.

La propagación *in vitro* ha ofrecido varias ventajas para los plátanos y bananos, tales como: disponer de una mayor tasa de multiplicación del material vegetal sano (libre de plagas y enfermedades), mayor disponibilidad para realizar la plantación así como la reducción del espacio requerido para dicho propósito.

Desde 1972 las técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado para la multiplicación de diferentes cultivares de bananos y plátanos, mediante el empleo de ápices (Ma y Shii, 1972). Ya en 1980, un elevado número de especies de *Musa* y cultivares de todo tipo de constitución genómica habían sido propagados mediante el cultivo *in vitro* (Vuylsteke, 1989).

La micropropagación vía organogénesis, mediante yemas axilares, es la técnica de cultivo más conocida y empleada en muchos países a escala comercial para multiplicar cultivares de *Musa*, además es el método más confiable para lograr un proceso de proliferación repetible, sin modificaciones genéticas y libres de microorganismos contaminantes (Orellana, 1998).

Por otra parte, varias investigaciones acerca del género *Musa*, han utilizado la embriogénesis somática y el cultivo de células, para la multiplicación masiva o con interés particular en el mejoramiento genético (Cote *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 2002). Los sistemas de inmersión temporal (SIT) han sido aplicados también para multiplicación de materiales vegetales de interés (Ventura *et al.*, 1998). Otros autores han dirigido sus esfuerzos hacia la producción de semilla artificial mediante la encapsulación de embriones somáticos o yemas de bananos y plátanos las cuales han recibido considerable atención en años recientes como alternativa interesante de propagación (Rao *et al.*, 1993; Ganapathi *et al.*, 2001).

El uso y la aplicación de las técnicas para la micropropagación ha mejorado el manejo del germoplasma sano a escala mundial, así como para propósitos tales como: propagación clonal, producciones uniformes y mejoramiento genético. La micropropagación ha jugado un papel importante en los programas de mejoramiento genético de los plátanos y bananos en todo el mundo (Vuylsteke *et al.*, 1997).

El material vegetal de plátanos y bananos obtenido por micropropagación es igual o superior al propagado por métodos convencionales (Smith y Drew 1990a; Vuylsteke 1998). Las plantas micropropagadas se establecen mucho más rápido, crecen con mayor vigor, tienen un ciclo productivo más corto, uniforme y los rendimientos son superiores respecto a los propágulos convencionales (Drew y Smith 1990; Robinson *et al.*, 1993; Vuylsteke y Ortiz, 1996). Las ganancias respecto a los rendimientos máximos de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* varían de un 20% en bananos hasta un 70% en plátanos.

Los resultados de la mejora de bananos y plátanos por vía de la biotecnología vegetal, se han introducido con mayor rapidez en comparación con

los métodos tradicionales. El uso de la biotecnología podría ofrecer un valioso medio de generación y obtención de plantas de banano y plátanos resistentes a la Sigatoka negra. Una de las ventajas de los métodos biotecnológicos para la obtención de variedades resistentes es que permite trabajar con un elevado número de individuos y aumenta de esta forma la posibilidad de encontrar los caracteres deseados. Además, existe un control de la concentración de inóculo, del ambiente y el acceso a las plantas libres de la enfermedad (Escalant, 1989).

La variación somaclonal, la mutagénesis y la selección *in vitro* en el género *Musa* se han empleado con éxito en varios programas de mejoramiento genético (Novak y Van Duren, 1989; Escalant, 1989; Okole y Schulz, 1997; Rodríguez *et al.*, 1997; Johanson, 1998; IAEA, 2002; Roux *et al.*, 2003). Más recientemente se ha comenzado a trabajar en la transformación genética de este cultivo para conferir resistencia a enfermedades fúngicas (Swennen *et al.*, 2003).

Resultados de los programas de mejoramiento genético de *Musa* spp. para la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* y *Mycosphaerella fijiensis*.

Los bananos y plátanos son cultivos difíciles de mejorar genéticamente debido a que la mayoría de los cultivares importantes y populares son estériles, no producen semillas y son partenocárpicos. A pesar de esto, los programas de mejoramiento genético han obtenido cierto progreso en años recientes y como resultado empiezan a aparecer nuevas variedades disponibles para su evaluación. Sin embargo, considerando su importancia como alimento básico, *Musa* sigue siendo un cultivo poco investigado (Swennen *et al.*, 2003).

El trabajo de mejoramiento genético convencional comenzó en los años 20, en el *Imperial College of Tropical Agriculture*, en Trinidad y un poco más tarde en Jamaica con un programa paralelo. Los primeros esfuerzos para conseguir un híbrido resistente fueron dirigidos a la enfermedad Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*), que había hecho su aparición en el Caribe afectando al cultivar 'Gros Michel', ampliamente utilizado en la exportación mundial. Esto llevó al inicio del programa a cargo de *United Fruit Company*, en 1959, en Honduras. Más tarde, en 1984 este pasó al gobierno de Honduras, que se mantuvo a cargo de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), la cual recuperó el programa inicial y desarrolló diploides y tetraploides híbridos con resistencia a la Sigatoka negra.

Muchos de los programas que se llevan a cabo para el mejoramiento genético se basan en la utilización

de la resistencia encontrada en especies silvestres de *Musa* tales como: *Musa acuminata* sp. *burmannica*, *Musa acuminata* sp. *malaccensis* y *Musa acuminata* sp. *siamea*, también en los cultivares diploides 'Pak' (AA), 'Pisan' lilin (AA), algunos triploides como 'Yangambi km 5' (AAA), 'Saba' (ABB) y 'Pisang Ceylan' (ABB) (Hernández, 1995).

Programa de la FHIA en la búsqueda de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y *Mycosphaerella fijiensis*

El objetivo principal del programa de mejoramiento genético llevado a cabo por la Federación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) ha estado dirigido hacia la búsqueda de nuevos híbridos de bananos y plátanos que fueran resistentes a las principales enfermedades e insectos de importancia económica. Colateralmente los híbridos resultantes serían evaluados en condiciones de cultivo adversas para seleccionar los más promisorios. Con estos híbridos se proyectó reducir el consumo de plaguicidas y químicos y de este modo contribuir a un manejo sustentable que incluyera no solo la producción sino también la productividad (Rowe y Rosales, 1996).

Este programa ha sido de los más exitosos dentro del mejoramiento genético por vía tradicional. Muchas de las variedades creadas por este programa se utilizan comercialmente en cerca de 50 países que ocupan territorios en Asia, África, América Latina y Oceanía.

La FHIA ha puesto a disposición de la comunidad internacional varios híbridos. La principal característica de los mismos radica en su resistencia frente a *M. fijiensis* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, los cuales han devastado numerosas plantaciones en las principales zonas productivas del mundo. Por otra parte, varios contribuyen positivamente a la alimentación en diferentes países. Los híbridos 'FHIA-01' y 'FHIA-02' han sido introducidos incluso en mercados de exportación de productos orgánicos (Rowe y Rosales, 1996).

El cultivar 'FHIA-03' se asemeja a la variedad tradicional 'moroca', que ha sido parte integral de la dieta de millones de habitantes en América, Asia y África. Este cultivar es altamente resistente tanto al marchitamiento bacteriano (Moko) como a *M. fijiensis*, es muy productivo aún en condiciones de suelos de baja fertilidad y seco donde otros cultivares no se pueden desarrollar. Este banano es capaz de prosperar en condiciones limitadas desde el punto de vista agrícola y ecológico. Además, ha contribuido a la seguridad alimentaria de varias regiones donde el cultivo de plátanos y bananos tiene bajos rendimientos.

Por otra parte, el cultivar híbrido 'FHIA-21' constituye una alternativa interesante para sustituir al tradicional cultivar de plátano Cuerno o *Horn plantain*. También muestra resistencia parcial frente a *M. fijiensis* y posee excelentes rendimientos en condiciones del manejo local de pequeños productores, los cuales son dos o tres veces superiores a los del tradicional plátano Cuerno. El 'FHIA-21', ha tenido muy buena acogida en pequeños y medianos productores en países tales como: Honduras, Nicaragua, Guatemala, Ecuador, Costa Rica y Cuba.

Programa del IITA en la búsqueda de resistencia a Fusarium oxysporum f. sp. cubense y Mycosphaerella fijiensis.

El instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) en Nigeria), mediante el uso de técnicas básicas, estrategias e investigaciones aplicadas, ha desarrollado híbridos de plátanos con resistencia a la Sigatoka negra, la cual constituye la principal limitante en la producción de plátanos y bananos en las regiones del África Sub-Sahariana. Allí se produce cerca del 75% del plátano que se consume mundialmente y supera en importancia a cultivos básicos como el maíz, arroz y la yuca (Hahn *et al.*, 1990; Gauhl *et al.*, 1993; Mobambo *et al.*, 1993; Ortiz *et al.*, 1993; Ferris *et al.*, 1994).

Debido a que *Mycosphaerella fijiensis*, destruye anualmente un 30-50% de las plantaciones en dicha región, se justificó la creación de un programa de mejoramiento genético mediante los métodos clásicos de hibridación, a pesar de que la mayoría de los genotipos de *Musa* utilizados fueron triploides y en ocasiones completamente estériles (Vuylsteke *et al.*, 1990, Vuylsteke *et al.*, 1994).

La metodología de mejoramiento genético adoptada por el IITA comprende la producción de híbridos tetraploides obtenidos a partir del cruzamiento de genotipos triploides con diploides. Los triploides susceptibles fueron empleados como parentales femeninos para la producción de 'huevos' triploides fértiles, mientras que los diploides actuaron como parentales masculinos para producir polen haploide normal. Los parentales diploides fueron utilizados como fuente de genes de resistencia a la Sigatoka negra (Swennen *et al.*, 1989; Vuylsteke *et al.*, 1993).

Desde 1987, el IITA ha desarrollado híbridos partenocárpicos resistentes a la Sigatoka negra, mediante la combinación de los nuevos avances de la biotecnología vegetal (cruzamientos interespecíficos, manipulación de la ploidía, cultivo *in vitro*), en combinación con los métodos convencionales de mejoramiento tales como: evaluación y selección en campo (Johanson,

1998). A medida que fueron profundizando en las investigaciones lograron crear nuevas metodologías de mejoramiento genético de los bananos y plátanos.

Dentro de los principales híbridos de plátanos TMPx que han sido seleccionados por su resistencia parcial a la Sigatoka negra, tomando en cuenta el criterio de que al menos seis hojas estuvieran completamente limpias al momento de la floración, se encuentran los siguientes genotipos: TMPx 548-4 OL x C4, TMPx 548-9 OL x C4, TMPx 582-4 BT x C4, TMPx 1621-1 OL x C4, TMPx 1658-4 OL x PL, TMPx 2637-49 OL x C4, TMPx 2796-5 BT x PL, TMPx 4479-1 BT x C4, TMPx 4698-1 OL x C4, TMPx 4744-1 OL x C4, TMPx 5511-2 OL x C4, TMPx 5706-1 OL x C4, TMPx 6930-1 OL x C4, TMPx 7002-1 OL x C4 (Swennen y Vuylsteke, 1993).

Programas de mejoramiento genético con uso de la mutagénesis en la búsqueda de resistencia a Fusarium oxysporum f. sp. cubense y Mycosphaerella fijiensis.

Las técnicas mutagénicas que inducen cambios heredables en la constitución genética de una célula mediante la alteración de su ácido desoxirribonucleico (ADN), han sido empleadas con éxito en varios programas de mejoramiento genético. Dentro de los principales tipos de mutaciones inducidas aparecen la poliploidía, la aneuploidía y las mutaciones génicas (Pérez, 1998). Para ello se emplean agentes mutagénicos físicos y químicos. La mutagénesis se ha empleado con éxito en programas de mejoramiento genético para la resistencia a factores bióticos y abióticos (Orellana, 1998). Varios programas de mejoramiento genético de bananos y plátanos que emplean la mutagénesis en la búsqueda de resistencia frente a hongos fitopatógenos y fitonemátodos se continúan desarrollando en diversas instituciones científicas (IAEA, 2002).

El programa de mejoramiento del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT, Cuba) trabaja en la obtención de bananos y plátanos con resistencia a la Sigatoka negra, mediante el empleo de radiaciones, en la introducción de genotipos foráneos, la hibridación tradicional y la variación somaclonal (Rodríguez *et al.*, 1997).

A través de programa de mejoramiento genético vía mutagénesis llevado a cabo en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (IBP, Cuba) se lograron obtener genotipos con una mejor respuesta frente a Foc en evaluaciones en cantero mediante inoculación artificial y en condiciones naturales con infección natural (Bermúdez-

Caraballoso *et al.*, 2004). En esta misma Institución se trabajó en un programa similar pero en la búsqueda de resistencia a *M. fijiensis*, el cual no logró obtener resultados satisfactorios ya que los genotipos seleccionados no mostraron este carácter en evaluaciones sucesivas (García *et al.*, 2004).

Bhagwat y Duncan (2006), utilizaron explantes de plantas de bananos cultivadas *in vitro* (*Musa* spp., AAA Grupo Highgate), los cuales fueron sometidos a diferentes dosis de radiaciones Gamma para evaluar la efectividad de esta técnica mutagénica en la producción de variantes tolerantes frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Los resultados de este trabajo mostraron que con las dosis de 0.8 y 2.0 krad, se logró la selección de plantas tolerantes a *Fusarium* en condiciones de invernadero.

Utilización de la variación somaclonal en la búsqueda de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y *Mycosphaerella fijiensis*

La variación somaclonal comprende los cambios genéticos o epigenéticos inducidos durante la fase de callo de las células vegetales cultivadas *in vitro*. En ocasiones resultan visibles como un cambio fenotípico en las plantas regeneradas de los cultivos. La misma se ha considerado como una herramienta importante para el mejoramiento genético (Stover y Simmonds, 1987).

En el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT, Cuba), se obtuvo el tetraploide 'SH3436-9' (AAAA), variante somaclonal del 'SH3436' (Highgate x SH3142) (Rodríguez *et al.*, 1997), el cual ha mostrado una adecuada resistencia a la raza 1 de Foc y niveles de tolerancia a *M. fijiensis*.

Hwang y Ko (2004) a través de un programa de mejoramiento genético basado en la variación somaclonal y obtuvieron genotipos resistentes del subgrupo Cavendish frente a Foc en suelos naturalmente infectados. Seis somaclones, de un total de 20 000, fueron finalmente seleccionados y mostraron resistencia en campo. Sin embargo, desde el punto de vista morfológico y agroproductivo sus cualidades fueron inferiores al control.

Uso de la transformación genética en la búsqueda de resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* y *Mycosphaerella fijiensis*

El potencial de contribución de la ingeniería genética en el mejoramiento genético de los cultivos en ocasiones no ha sido comprendido en toda su magnitud, debido a que aun la percepción de esta tecnología, aunque ya popularizada, no es bien interpretada. Se ve limitada, además, debido a la poca disponibilidad de genes de interés,

el pobre entendimiento de su funcionamiento y el desconocimiento del costo metabólico asociado con la inserción de nuevos genes y las interacciones que pueden ocurrir sobre todo para caracteres cuantitativos de plantas. La transformación se ha utilizado como un medio para simplificar la naturaleza compleja del mejoramiento genético de las plantas y que este sea sostenible desde el punto de vista agrícola (Simoens y Van Montagu, 1995; Simmonds, 1997).

Teniendo en cuenta lo anterior se hace necesario definir claramente los genes candidatos para ser empleados en la ingeniería genética que puede ser una herramienta novedosa e importante para los actuales programas de mejoramiento genético de *Musa*. En principio la ingeniería genética solo trabajaría con aquellos genes que representen caracteres importantes para ser introducidos en un germoplasma élite para su posterior perfeccionamiento a través de los métodos tradicionales de mejoramiento de *Musa*.

Sin embargo, las regulaciones gubernamentales pueden constituir el mayor obstáculo para la liberación de un genotipo transgénico de *Musa* spp. La aceptación y la percepción pública de dichos genotipos deben constituir el mayor reto para los mejoradores y biotecnólogos de *Musa* spp. (Aguilar y Colman, 2006).

Los métodos de transferencia asexual de genes mediante la transformación genética pueden ser utilizados para la introducción de caracteres ausentes en los bancos genéticos actualmente disponibles de *Musa*, así como en el mejoramiento genético de cultivares de *Musa* que no se pueden implementar a través del cruzamiento genético convencional tales como los bananos del subgrupo Cavendish y los plátanos pertenecientes al subgrupo *Horn plantains*. Un relativo éxito en la ingeniería genética de bananos y plátanos se ha logrado a través de la transferencia de genes de otras especies dentro de células de plantas (Sági *et al.*, 1995).

Para la transformación genética de cultivares de bananos y plátanos se han utilizado diferentes protocolos entre los que se encuentran la electroporación de protoplastos derivados de suspensiones celulares embriogénicas (Sagi *et al.*, 1994), el bombardeo de partículas de suspensiones de células embriogénicas (Sagi *et al.*, 1995), así como el co-cultivo de meristemas (con heridas practicadas mecánicamente) (May *et al.* 1995) y el uso de agregados embriogénicos (Bermúdez-Caraballoso *et al.*, 2004) con *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformación genética vía *Agrobacterium*, es la de mayores expectativas para su aplicación, a través del empleo de tejidos diferenciados que

pueden ser regenerados en plantas. Este método además ha sido aplicado en un gran número de cultivares de *Musa* e híbridos sintéticos (Bosque *et al.*, 1998, Ganapathi *et al.*, 2001, Khanna *et al.*, 2004, Ortiz *et al.*, 2005, Remy *et al.*, 2005).

Otras investigaciones se han desarrollado usando la biotecnología y en particular la producción de plantas transgénicas que emplean genes que codifican para proteínas antifúngicas (Swennen *et al.*, 2003). Sin embargo, este método tiene la desventaja de conferir resistencia monogénica la cual es considerada poco durable por la diversidad genética de las poblaciones de *Mycosphaerella*. No obstante, esta estrategia pudiera constituir una solución adecuada para lograr una resistencia durable en plantas con genes que confieran resistencia parcial (Mourichon, 2003).

Entre las estrategias más atractivas en la búsqueda de resistencia a las enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola, está la obtención de plantas transgénicas que expresen genes de resistencia que codifiquen para la síntesis de enzimas hidrolíticas de origen fúngico o bacteriano (Lorito *et al.*, 1998). Asimismo, la introducción de genes que expresen elicitores, que medien la respuesta defensiva (Keller *et al.*, 1999) y péptidos con actividad antimicrobiana (*Antimicrobial peptides*) (Cary *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Estos últimos poseen un amplio espectro de actividad contra hongos y bacterias y la mayoría no son tóxicos para plantas ni mamíferos. Algunos ejemplos de estos compuestos lo constituyen: magaininas aisladas a partir de la una especie de rana africana (Bevins y Zasloff, 1990), cecropinas a partir de la mosca de seda gigante (Boman y Hultmark, 1987), proteínas de mamíferos (Ganz y Lehrer, 1994) y defensinas de plantas (Broekaert *et al.*, 1995). La cecropina (De Lucca *et al.*, 1997; Alan y Earle, 2002) y sus derivados (D4E1) (Cary *et al.*, 2000; Rajasekaran *et al.*, 2001) así como también péptidos híbridos con la melitina (Osusky *et al.*, 2000) han mostrado potencial inhibitorio del crecimiento y desarrollo *in vitro* de importantes patógenos fúngicos. También para varios péptidos quiméricos del tipo cecropina–melitina se ha comprobado actividad antifúngica en ensayos de evaluación en condiciones de campo frente a *Verticillium dahliae* en el cultivo de la papa (Osusky *et al.*, 2000).

De manera similar, la magainina ha sido efectiva contra algunas especies de hongos (Kristyanne *et al.*, 1997). Li *et al.* (2001) demostraron la expresión reforzada de resistencia en líneas transgénicas de tabaco que expresaban un análogo de la magainina (Myp30). Chakrabarti *et al.* (2003) comprobaron la expresión exitosa de este péptido sintético y observaron una resistencia

reforzada en plantas de tabaco y bananos. Basados en el amplio espectro de acción de la actividad antifúngica ya sea desde el punto de vista individual o combinado de la cecropina, magainina y sus derivados en el cultivo de bananos podría incrementar la resistencia a importantes patógenos fúngicos.

También se ha demostrado la aplicación exitosa de proteínas de origen vegetal que presentan diferentes actividades antifúngicas (Broekaert *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1997). Estas pueden ser candidatos en la búsqueda de resistencia en el cultivo de plátanos y bananos debido a su probada actividad *in vitro* frente a patógenos como *Mycosphaerella fijiensis* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, sin dejar de mencionar su efecto inocuo en humanos, mamífero y en los propios tejidos vegetales.

Varios cientos de líneas transgénicas de *Musa* en particular de plátanos que expresan AMPs han sido desarrolladas en diferentes laboratorios (KULeuven, IBP) (Remy, 2000, Kosky *et al.*, 2004).

Según Pérez (2000) existen varias clases de proteínas antifúngicas involucradas en la inhibición de la síntesis de la pared celular del hongo o que deterioran su estructura y/o sus funciones; pudiendo ocurrir otras perturbaciones de la estructura de la membrana celular del hongo provocando la lisis celular de este y con ello la muerte.

De acuerdo con Selitrennikoff (2001), entre las proteínas antifúngicas más conocidas están: Proteínas relacionadas con la patogénesis PR, (*pathogenesis related proteins*). Las plantas al ser expuestas a patógenos como hongos y virus, producen compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular llamadas: fitoalexinas, péptidos antimicrobianos y pequeñas proteínas (tioninas y defensinas).

Existen otros grupos de proteínas con actividad antifúngica entre ellas: las proteínas que transfieren lípidos (*Lipid Transfer proteins*), proteínas asesinas (*Killer protein*), las inhibidoras de proteasas, entre otras (Selitrennikoff, 2001).

Una posible solución al serio problema causado por la Sigatoka negra, en el cultivo de plátanos y bananos, está dirigida hacia la generación de variedades con resistencia incorporada (Gómez-Lim *et al.*, 2004). Para ello, se han utilizado genes que codifican para proteínas de defensa contra hongos como las defensinas (Broekaert *et al.*, 1995), péptidos antimicrobianos (Maloy y Karim, 1995), quitinasas y glucanasas (Melchers y Stuiver, 2000). Se han regenerado plantas transgénicas de banano de varios cultivares con

construcciones que expresan proteínas del tipo defensinas (Remy *et al.*, 1998), quitinasas y glucanasas (Chong *et al.*, 2004; Gómez-Lim *et al.*, 2004) y magaininas (Chakrabarti *et al.*, 2003).

Evaluación de la resistencia de genotipos de *Musa* spp. frente *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc).

La evaluación de la resistencia a las diferentes razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* es el primero y más importante de todos los pasos seguidos para seleccionar un nuevo material vegetal mejorado. Los primeros procedimientos de evaluación fueron inadecuados, ya que los clones tetraploides supuestamente resistentes fueron atacados después por la raza 4. Existen dos sistemas fundamentales de evaluación: (1) rizomas sembrados en el campo o cantero con inóculo natural o artificial y (2) plántulas, rizomas pequeños o plantas procedentes del cultivo *in vitro* sembradas en macetas con inoculación artificial (Stover y Buddenhagen, 1986).

Evaluaciones en campo

La evaluación de clones tetraploides se desarrolló hasta 1965, como parte del programa de mejoramiento genético de Jamaica, mediante la siembra de estos en zonas donde se habían extraído plantas enfermas de 'Gros Michel' (Simmonds, 1966). Como criterio de evaluación consideraron que si más de dos plantas de cada diez presentaban síntomas internos o externos de la enfermedad, el clon se descartaba. Pero, si solamente se enfermaban una o dos plantas el clon permanecía y entonces se procedía a la realización de observaciones periódicas para la detección de posibles respuestas a la marchitez causada por Foc.

Otro método consiste en la siembra de genotipos en hoyos que contenían restos de plantas infectadas con las razas 1 y 2. Esta estrategia de evaluación comprendía de 18 a 24 meses para evaluar la respuesta a la enfermedad (Rowe y Richardson, 1975).

Hwang *et al.* (1994) encontraron un clon del subgrupo Cavendish (GCTCV-215-1) resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 durante el período evaluado en condiciones de campo. Este genotipo mostró un 4.8% de síntomas de marchitez mientras que en el clon Cavendish Gigante manifestó un 39.1%.

La evaluación de nuevos genotipos en suelos naturalmente infectados ha sido un método comúnmente utilizado. Por ejemplo: Houbin *et al.* (2004) evaluaron la resistencia de clones de bananos en campo con suelo infectado naturalmente con la raza 4 de Foc en China. Las evaluaciones fueron realizadas a los 12 meses

después de la plantación y consistieron en determinar el porcentaje de plantas que habían sobrevivido al ataque del patógeno, en combinación con la presencia de síntomas externos y decoloración vascular de los tejidos. Teniendo en cuenta dichos criterios los genotipos fueron clasificados como susceptibles (Williams, 'FHIA-17', 'Gros Michel', 'Baxijiao'), intermedio ('CRBP-39', 'TMBx5295-1', 'FHIA-17', 'FHIA-18', 'SH-3640' y 'SH3436-9') y resistentes ('FHIA-02', 'FHIA-03', 'Rose', 'FHIA-23', 'GCTCV-119' y 'FHIA-21').

Evaluación en macetas

Cuando la raza 2 y otra raza no identificada se detectaron en Jamaica, la evaluación de la resistencia se desarrolló a partir de pruebas en macetas, en condiciones controladas en casa de cultivo. No obstante, las pruebas en macetas no siempre tenían correlación con las pruebas en campo. Por ello, se planteó que la resistencia al Mal de Panamá no estaba suficientemente estudiada y los clones se clasificaron de acuerdo con la frecuencia y síntomas evidentes o síntomas internos del cormo con respecto a las plantas sanas (Menéndez y Shepherd, 1975).

Sherpherd y Lacy (1968) seleccionaron plántulas de clones diploides, en macetas inoculadas con una suspensión concentrada de esporas del patógeno, dado a que los diploides resultado de selecciones rutinarias demostraban un nivel insuficiente de resistencia a la marchitez. Por su parte, Vakili (1965) también seleccionó plántulas en macetas y sus técnicas fueron las más rigurosas de todas las pruebas descritas. Las mismas consistieron en sumergir plántulas enraizadas durante una noche en una suspensión de esporas y luego transplantarlas a macetas y evaluarlas durante un mes. Posteriormente se seleccionaban las plantas sobrevivientes, las cuales eran transferidas a nuevas macetas para realizar la inoculación del suelo con una suspensión conidial. En esta segunda selección se utilizó el bioensayo del corte de raíz en las plántulas sobrevivientes para facilitar el proceso infeccioso.

Sun y Su (1984) probaron la respuesta a la raza 1 y 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de plantas derivadas del cultivo de meristemos. Estas se lavaron en agua corriente y se colocaron en una suspensión conidial por un minuto. Las plantas inoculadas se replantaron e incubaron a 28 °C en una cámara de crecimiento. A las dos semanas posteriores a la inoculación casi todas las plantas mostraron síntomas externos de amarillamiento de las hojas y en cuatro semanas se observó la caída y muerte de las hojas y del pseudotallo. Mediante esta técnica, la respuesta diferencial del cv. 'Cocos' (un 'Gros Michel' semienano) y los cv. Cavendish

a la raza 4 (y no a la raza 1) se estableció fácilmente. Estos autores plantearon que las plantas provenientes del cultivo de tejidos son materiales prometedores para seleccionar resistencia a la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Por otra parte, Hwang *et al.* (1984) establecieron un programa de evaluación masiva para detectar resistencia a la raza 4, donde las plantas provenientes del cultivo *in vitro* se plantaron en macetas que contenían suelo infectado con el patógeno. Después de 3 a 4 meses las plantas sobrevivientes se seleccionaron y los rizomas se examinaron para obtener evidencias de infección. Las plantas libres de infección se multiplicaron *in vitro* para la realización de las pruebas adicionales.

De igual forma, Novak *et al.* (1992) mediante la técnica de corte de raíz, inocularon plántulas enraizadas de banano con una suspensión conidial (5×10^5 conidios/ml) durante 10 minutos y obtuvieron alrededor de las 2-3 semanas después del tratamiento síntomas de marchitez en los genotipos susceptibles.

Matsumoto *et al.* (1995) realizaron bioensayos de tolerancia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 en plántulas de un mes de aclimatizadas y en minirrizomas de 4 meses en esta misma fase. Los minirrizomas seleccionados mostraron tolerancia a la enfermedad, lo cual no fue observado en las plántulas.

En el Instituto de Biotecnología de las Plantas en el programa de mejoramiento genético para la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* se ha trabajado con la utilización de la variación somaclonal, la inducción de mutaciones y la evaluación *in vitro* en los cultivares 'Gros Michel' (*Musa* AAA) y 'Manzano' (*Musa* AAB). De una población de 17 000 somaclones se seleccionaron después de cinco ciclos en campo, cuatro somaclones de 'Gros Michel' que mostraron resistencia a Foc (Pérez *et al.*, 2000).

En un estudio ultraestructural realizado por Hecht-Buchholz *et al.* (1998) en plántulas del cultivar 'Cavendish Enano', cultivadas en hidropónico e infectadas y no infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4, estos autores evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de zinc y demostraron que los mecanismos de defensa tales como la formación de tilosomas, están influenciados por los niveles de este compuesto.

Gunavathi *et al.* (2004), evaluaron la respuesta de ocho híbridos de bananos, cinco cultivares utilizados como parentales y siete cultivares comerciales en invernadero frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (raza 1) así como el

complejo *Fusarium*-nemátodos (*Fusarium* y una población mezclada de los fitonemátodos: *Pratylenchus coffeae*, *Radopholus similis* y *Helicotylenchus multicinctus*). Los híbridos incluidos en dicho estudio fueron: 'H-59' (AA), 'H-65' (AA), 'H-103' (AA), 'H-109' (AA), 'H-110' (AA), 'H-201' (AA), 'H 107' (AA), H 96/7 (ABB). Los cultivares parentales fueron: 'Matti', 'Anaikomban', 'Pisang lilin', 'Sannachenkadali' y 'Namarai' (todos AA) así como los cultivares comerciales 'Red banana' (AAA), 'Robusta' (AAA), 'Rasthali' (Silk, AAA), 'CO.1' (AAA), 'Nendran' (French Plantain, AAB), 'Poovan' (Mysore, AAB) y 'Karpooravalli' ('Pisang awak', ABB). De los 20 genotipos evaluados, los híbridos diploides 'H-65', 'H-109', 'H.103' y 'H-201', los parentales 'Anaikomban', 'Pisang lilin', 'Tongat' y el cultivar comercial 'Robusta' mostraron niveles de resistencia al marchitamiento por *Fusarium* mientras que el resto mostraron susceptibilidad. Cuando los genotipos fueron evaluados frente al complejo *Fusarium*-fitonemátodos, los híbridos 'H-65', 'H-103', 'H-109' y 'H-201', los parentales 'Anaikomban' y 'Pisang lilin' fueron menos afectados que el resto de los genotipos. Esto demostró su potencial como fuentes de resistencia en los programas de mejoramiento genético.

Un método novedoso y útil fue desarrollado por Mak *et al.* (2004), estos autores emplearon una doble bandeja (una interna perforada que contiene substrato estéril, se utiliza para el cultivo de plantas procedentes del cultivo de tejidos), la misma descansa sobre otra bandeja externa de mayor tamaño que contiene una solución nutritiva de Hoagland así como un lixiviado de esporas del patógeno. Mediante este método se han logrado evaluar los siguientes cultivares de banano 'Intan' (Pisang Berangan, AAA), 'Gold Finger' (AAAB), 'Novaria' (Cavendish, AAA), y 'Mutiaru' (accesión mejorada del 'Pisang Rastali', AAB). Este método además de ser rápido y reproducible, permitió eliminar la contaminación cruzada de razas de Foc, así como evaluar la patogenicidad y virulencia de múltiples aislados de Foc. Por otra parte se pudo caracterizar la respuesta de varios cultivares referenciales bajo condiciones controladas y permitir su posterior implementación en apoyo a los programas de mejoramiento genético sin que los factores ambientales fueran una impedimenta en la evaluación de la resistencia.

Selección *in vitro*

La selección *in vitro* es un método que permite la identificación de genotipos resistentes en una población de plantas cultivadas *in vitro*. Filtrados de cultivo de Foc han sido utilizados como agente selectivo por diversos investigadores.

Mendes *et al.* (1993) mediante la utilización de la

técnica de difusión del filtrado en el medio de cultivo, lograron reproducir la respuesta de clones susceptibles y resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, después de 4 semanas de exposición en el medio. Matsumoto *et al.* (1999) realizaron la selección de mutantes del cv. 'Manzano' (AAB, susceptible) resistentes al Mal de Panamá.

Cárdenas *et al.* (2004) evaluaron el efecto del filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) en microsecciones de rizomas de bananos sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de bananos en fase de enraizamiento. Estos autores utilizaron concentraciones del filtrado de cultivo entre 40 y 60%, las cuales fueron efectivas para la selección temprana de plantas *in vitro* del cv. 'Gros Michel' (AAA) resistentes al patógeno. En condiciones de aclimatización, la incidencia de la enfermedad en 'Gros Michel' fue del 75% inferior en plantas que habían sido preseleccionadas con el filtrado de cultivo con respecto a plantas control. Además, la severidad interna de los síntomas detectada por la decoloración de los rizomas, fue 70% inferior en plantas preseleccionadas con el filtrado de cultivo. Estos resultados indicaron la posibilidad de utilizar el filtrado de cultivo de Foc como agente selectivo *in vitro* en la búsqueda de resistencia a la marchitez causada por *Fusarium*. Estas plantas seleccionadas fueron evaluadas en condiciones de infección natural y durante su primer ciclo no se detectaron plantas enfermas.

Companioni *et al.* (2005) lograron diferenciar la respuesta entre cultivares de bananos, a través de funciones discriminantes y componentes principales, mediante un bioensayo de punción en hojas arrancadas, utilizando el filtrado de cultivo de *Fusarium* como agente selectivo. Este método mostró ser efectivo en una validación efectuada en diferentes cultivares de *Musa* procedentes de campo, mediante la evaluación de diversos parámetros bioquímicos.

Como se puede apreciar en lo tratado con anterioridad, existe una amplia diversidad de métodos de evaluación de la resistencia al Mal de Panamá en cultivares de *Musa* spp. El INIBAP facilita cultivares referenciados, contra los cuales deben ser evaluados los nuevos genotipos mejorados con respecto a su respuesta al marchitamiento causado por *Fusarium*. Entre estos están: 'Gros Michel' (AAA) susceptible a Raza 1, ITC1122; 'Bluggoe' (ABB) susceptible a Raza 2, ITC0643; Cavendish (AAA) cv. 'Williams' susceptible a Raza 4, ITC0570; cv. 'Rose' resistente a la raza ITC0712 (Carrier *et al.*, 2003).

Evaluación de la resistencia de genotipos de *Musa* spp. frente a *M.fijiensis*

Las enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* spp. son las más

importantes de los bananos y plátanos en el contexto mundial. Se han elaborado documentos que proporcionan información útil a través del uso de protocolos para la evaluación de la resistencia a estos patógenos (Carrier *et al.*, 2003). Las evaluaciones extensivas de la resistencia frente *M.fijiensis* utilizan metodologías simplificadas para obtener la información necesaria sobre la respuesta de los genotipos de interés, bajo las condiciones locales que requiera cada estudio, así como la información básica sobre la resistencia y tolerancia a dichas enfermedades.

Evaluación en campo

La evaluación en campo en condiciones naturales de infección fue durante mucho tiempo el único método disponible para seleccionar los cultivares de *Musa* resistentes a la Sigatoka negra. Aunque es relativamente simple está condicionado por factores medioambientales (clima, suelo, temperatura, humedad) que pueden afectar la expresión de la resistencia. Además, se requiere un gran número de observaciones debido a irregularidades en la distribución de la densidad de inóculo y el desarrollo de la infección. Las condiciones variables y el alto costo del mantenimiento de las plantaciones en condiciones de campo, hacen que los procesos de evaluación sean inconvenientes como una prueba rápida para identificar genotipos resistentes. Las evaluaciones en el campo además deben estar validadas por la comparación de los genotipos de interés con cultivares de referencia en pruebas multilocales (Mourichon, 1995).

La evaluación de plantas jóvenes de *Musa* para la respuesta a *M. fijiensis* con inóculo natural de plantas enfermas en condiciones de campo ha sido empleada para evaluación de genotipos de *Musa* procedentes de programas de mejoramiento genético. Sus resultados han sido comparables con los obtenidos en plantas adultas y contribuye a disminuir al menos la mitad del tiempo necesario para conocer la respuesta de las plantas a la enfermedad con respecto a ensayos donde se siembran las plantas en condiciones naturales (Mourichon *et al.*, 1987). Este método requiere menos espacio y atenciones respecto a las evaluaciones tradicionales y de este modo se reducen los costos para su mantenimiento.

La evaluación temprana de genotipos de *Musa* spp. frente a *M.fijiensis*, se ha abordado a través de la inoculación artificial mediante suspensiones conidiales (Mourichon *et al.*, 1987), mediante la evaluación *in vitro* con toxinas del patógeno (Molina y Krausz, 1989; Okole y Schulz, 1997; Lepoivre *et al.*, 2003) y la evaluación temprana en campo.

Mobambo *et al.* (1994), utilizaron plantas *in vitro* de tres híbridos de plátanos y los compararon con

sus progenitores femenino y masculino en cuanto a la respuesta a la Sigatoka negra. Para ello aclimatizaron las plantas en bolsas de polietileno durante ocho semanas hasta que alcanzaron aproximadamente 30 cm de altura. Posteriormente las bolsas se transfirieron a condiciones naturales en una parcela donde se encontraba sembrado un cultivar susceptible para garantizar una alta presión de inóculo. Después de dos meses evaluaron el tiempo de incubación, el tiempo de evolución de los síntomas, el tiempo de desarrollo de la enfermedad, la hoja más joven manchada y el tiempo de vida de la hoja. Los resultados validaron el uso del método utilizado.

Evaluación en casa de cultivo

El principal objetivo de varios programas de mejoramiento genético está dirigido hacia el incremento de la eficiencia de la selección de individuos resistentes de *Musa* frente a la enfermedad con el desarrollo de métodos de evaluación temprana que permitan realizar evaluaciones preliminares de los genotipos de interés (Mourichon, 1995).

La inoculación artificial en condiciones controladas simplifica los procesos de evaluación. Es un método apropiado para la producción de inóculo, para la evaluación de las plantas y la intensidad de los síntomas, además, puede ser utilizada para evaluar cultivares altamente resistentes (Resistencia cualitativa o vertical) y parcialmente resistente (Resistencia cuantitativa u horizontal), con el uso de aislados del patógeno que sean representativos en términos de agresividad y virulencia. Además, se puede controlar la presión de inóculo así como utilizar plantas de la misma edad y con un mayor grado de uniformidad (Mourichon *et al.*, 2000).

Según el informe de INIBAP presentado por el grupo de Sigatoka en el encuentro en Guadalupe en 1997 (Frison *et al.*, 1997) y ratificado en Costa Rica (Jácome *et al.*, 2003) en la tercera reunión de trabajo del grupo Sigatoka de PROMUSA una de las principales prioridades de investigación está relacionada con la implementación y estandarización de métodos de inoculación artificial en condiciones controladas. Por ello, los estudios de evaluación temprana de la resistencia a la Sigatoka negra mediante diferentes metodologías de inoculación artificial contribuirán a dar respuesta a este planteamiento.

Evaluación y selección in vitro

Según Kosky (1998) la evaluación *in vitro* puede utilizarse en la evaluación de resistencia a diversas enfermedades, debido a los rápidos avances de las técnicas del cultivo de tejidos para diferentes

hospederos y a las contribuciones que se han realizado en el campo de la fitopatología mediante las diferentes metodologías *in vitro*, en la interpretación de los mecanismos básicos de virulencia del patógeno y en los mecanismos de defensa del hospedero. El método más común en el desarrollo de sistemas de evaluación *in vitro*, para buscar la resistencia a enfermedades empleando el cultivo de tejidos ha sido el uso de las toxinas del patógeno como agente selectivo. Tanto las toxinas o el filtrado de cultivo pueden ser incorporados uniformemente a los medios de cultivos de células, órganos y plantas. Pérez (1998), refirió que la evaluación *in vitro*, permite aprovechar la variabilidad existente, siendo un método efectivo en la obtención de variedades en muchas especies de plantas.

La observación de los síntomas causados *M. fijiensis* en hojas de plátanos y bananos correspondientes a manchas necróticas rodeadas de bordes cloróticos, sugiere la participación de fitotoxinas en el avance y progresión de los mismos (Molina y Krausz, 1989). Algunos autores han desarrollado bioensayos para confirmar la liberación de fitotoxinas en filtrados de cultivo *M. fijiensis* (Harelimana *et al.*, 1997). Dentro de los principales compuestos aislados a partir del filtrado de cultivo de *M. fijiensis* se destacan: 2,4,8-trihidroxitetralone, 5-hidroxi-1,4-naphtalenedione (juglone), ácido 2-carboxi-3-hydroxicinnámico, ácido-dimetil-éster-2-carboxi-3-metoxicinnámico, ácido isocracínico y 4-hidroxicytalone (Bussogoro *et al.*, 2004).

Debido a que varias de las toxinas de *M. fijiensis* han mostrado su actividad biológica a través de bioensayos, existe la posibilidad de utilizarlas como agente selectivo en poblaciones de plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro*. La evaluación de genotipos resistentes mediante el empleo de las toxinas como agente selectivo requiere del conocimiento del mecanismo de acción de estas. Harelimana *et al.* (1997) demostró que los cloroplastos son los sitios de acción primaria de las toxinas de *M. fijiensis*.

Leegood y Malkin (1986) lograron a través de técnicas de laboratorio aislar los sistemas subcelulares que componen el aparato fotosintético contenidos en cloroplastos íntegros. Ello facilitó el estudio de efecto de metabolitos tóxicos producidos por agentes fitopatógenos a dicho nivel.

Varios métodos se han desarrollado para la evaluación de la resistencia de *Musa* spp. frente al filtrado de cultivo de *M. fijiensis* mediante la determinación de varios parámetros. Entre ellos se destacan: la inducción de necrosis en hojas, la determinación de la pérdida de electrolitos evaluando la conductividad, la medición de la fluorescencia clorofílica y la evaluación de la

inhibición del transporte electrónico a nivel de suspensiones de cloroplastos (Lepoivre *et al.*, 2003, Bussogoro *et al.*, 2004).

Sin embargo, Okole y Schulz (1997), refirieron un sistema para la evaluación *in vitro* de plantas resistentes a *M. fijiensis* con el uso de las toxinas del patógeno. Las mismas se adicionaron al medio de cultivo donde colocaron fragmentos cortados del pseudotallo (400µm) de plantas *in vitro*. Estos autores realizaron dos selecciones consecutivas y luego evaluaron en casa de cultivo las plantas regeneradas, las cuales mostraron niveles de resistencia frente a los metabolitos del hongo y a la inoculación artificial del patógeno con el empleo de conidios.

Según los resultados de García *et al.* (1997) en la evaluación *in vitro* de multiyemas y plantas *in vitro* de bananos, sugiere que este método puede constituir una herramienta útil en los programas de mejoramiento genético de bananos a la Sigatoka negra.

Busogoro *et al.* (2004), mediante suspensiones de cloroplastos obtenidas a partir de dos cultivares de banano ('Fougamou' y 'Grande Naine'), lograron establecer una correspondencia entre la resistencia de los cultivares de *Musa* spp. al juglone y la capacidad de las suspensiones de cloroplastos de reducir el colorante DCPIP (diclo-fenil-feno-indol), mediante un método espectrofotométrico (lectura a 595 nm). Estos autores atribuyeron además el efecto perjudicial del juglone sobre la integridad fotosintética debido a eventos oxidativos que provocaron la incapacidad de las células del cultivar susceptible de detoxificar eficientemente las especies reactivas de oxígeno. Los niveles de ácido ascórbico fueron considerados por dichos autores como un factor clave en la capacidad de los tejidos de bananos para enfrentar los eventos oxidativos provocados por la aplicación de las toxinas.

En este sentido Leiva-Mora *et al.* (2004) lograron demostrar el efecto del juglone (toxina producida por *Mycosphaerella fijiensis*) sobre el sistema antioxidante de las Superóxido dismutasas en los cultivares 'Fougamou' (ABB) y 'Grande naine' (AAA) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas. En ambos genotipos se observaron cambios en la expresión de este sistema isoenzimático antioxidante respecto a los controles sin aplicación de la toxina. En el cultivar 'Grande naine' (AAA), susceptible, a partir de las 4 h desapareció una isoforma presente en el control, mientras que en el 'Fougamou' (ABB) parcialmente resistente, a partir de las 2 h se observó una nueva isoforma la cual se mantuvo hasta las 48 h después de la inyección de juglone. Este resultado mostró una correspondencia entre los patrones proteicos de

isoformas del sistema de las superóxido dismutasas y la tolerancia al estrés oxidativo causado por el juglone en cultivares de *Musa* spp.

El-Hadrami *et al.* (2005) estudiaron la producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) en dos cultivares de bananos ('Grande naine' y 'Fougamou'), los cuales fueron altamente susceptible y tolerantes respectivamente al juglone. Estos autores observaron en el cultivar 'Fougamou' una temprana liberación de especies reactivas de oxígeno y peróxido de hidrógeno así como la estimulación temprana de los sistemas antioxidantes de las superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas a diferencia del cultivar 'Grande Naine' en el cual se observó una débil y tardía generación de los mismos.

El INIBAP a través de sus guías técnicas, mantiene un listado de genotipos disponibles los cuales se encuentran diagnosticados contra virus ('Yangambi km 5' altamente resistente, ITC1123; 'Calcutta 4', altamente resistente, ITC0249; 'Pisang liliin', parcialmente resistente (alto), ITC1400; 'Pisang Ceylan', parcialmente resistente, ITC1441; 'Pisang Berlin' susceptible, ITC0611; 'Grande naine' susceptible, ITC1256), los cuales son considerados como materiales de referencias en la evaluación de la resistencia de los nuevos genotipos mejorados en su respuesta al patógeno en campo.

Si se toma en consideración todo lo mencionado en el presente trabajo, se puede resumir que los bananos y plátanos significan la seguridad alimentaria en muchas regiones del mundo y por ello la necesidad de potenciar el mejoramiento genético frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y *Mycosphaerella fijiensis* (patógenos que amenazan con la desaparición de los mismos). Sin embargo, a pesar de lo difícil del mejoramiento genético de *Musa* spp., varios programas han logrado obtener y liberan híbridos resistentes frente a dichos patógenos fúngicos. La Biotecnología vegetal con el desarrollo de técnicas mutagénicas, el uso de la variación somaclonal, la embriogénesis somática y más recientemente el empleo de técnicas de transformación genética, ha logrado avances prometedores en el mejoramiento genético de *Musa* spp. Finalmente la evaluación en condiciones campo de la resistencia de genotipos de *Musa* spp. frente Foc y *M. fijiensis* deben complementarse con el desarrollo de metodologías de evaluación temprana reproducibles ya sea utilizando el patógeno o sus derivados.

REFERENCIAS

- Aguilar, FX, Kohlmann B (2006) Willingness to consume and produce transgenic bananas in Costa Rica. *International Journal of Consumer Studies*. 30 (6): 544-551
- Alan, AR, Earle ED (2002) Sensitivity of bacterial and fungal pathogens to the lytic peptides, MSI-99, magainin II, and cecropin B. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 15:701-708

- Banerjee, N, De-Langhe L (1985) A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). Plant Cell Reports 4: 351-354
- Bermúdez-Caraballosa, I, García L, Acosta M, Padrón Y, Herrera IL, Orellana PP, Veitia RN, Romero C, Clavelo J (2004) Agronomic performance of 'Gros Michel' somaclones selected for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. En: 2nd International Symposium on *Fusarium* wilt on banana. Salvador de Bahía. Brasil. 22-26 de Septiembre de 2003
- Bermúdez-Caraballosa, I, Kosky RG, Chong B, Reyes M, Machado JM, Portal O, Ocaña B, Alvarado- Capó Y, Leiva M, Acosta SM, Cruz MM, Roque PB, Swennen R, Sagi L, Hernández L (2004) Transformación genética mediada *Agrobacterium tumefaciens* de suspensiones celulares embriogénicas de banano cultivar 'Grande naine' (AAA). Biotechnología vegetal 4(1): 31-37
- Bevins, CL, Zasloff M (1990) Peptides from Frog Skin. Annual Review of Biochemistry 59:395-414
- Bhagwat, Duncan (2006) The Study on the pathogenesis and control of Banana vascular wilt. Chinese Agricultural Science Bulletin 22 (8): 515-519
- Boman HG, Hultmark D (1987) Cell free immunity in insects. Ann. Rev. Microbiol. 41: 103-126
- Bosque, NB, May GD, Arntzen CJ (1998) Applicability of an *Agrobacterium* system for the transformation of *Musa* species with diverse genomic constitution and ploidy level. Electronic Journal of Biotechnology 1 (1):1-10
- Broekaert, W, Terras F, Cammue B, Osborne R (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol. 108: 1353-1358
- Broekaert, W, Terras F, Cammue B, Osborne R (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol. 108: 1353-1358
- Broekaert, WF, Cammue BPA, De-Bolle M, Thevissen K, De-Samblanx G, Osborn RW (1997) Antimicrobial peptides from plants. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 297-323
- Busogoro, JP, Etame JJ, Harelimana G, Lognag G, Messiaen J, Lepoivre P, Van Cutsem P (2004) Experimental evidence for the action of *M. fijiensis* toxins on banana photosynthetic apparatus. En: Jain, SM, Swennen, R (ed). Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations, pp. 161-170. Science Publishers, Inc, Enfield
- Cardenas, JE, Pocasangre L, Riveros AS y Rosales F (2004) Early selection of vitroplants of 'Gros Michel' for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. En: 2nd International Symposium on *Fusarium* wilt on banana. Salvador de Bahía. Brasil. 22-26 de septiembre de 2003
- Carlier, J, De-Waele D, Escalant JV (2003) Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos. Guías Técnicas de INIBAP. (6) pp. 15-20. INIBAP. Montpellier
- Carlier, J, Fouré E, Gauhl F, Jones D, Lepoivre P, Mourichon X, Pasberg-Gauhl C, Romero R (2000) Black Leaf Streak. En: Jones, D (Ed.) Fungal Disease of the Foliage. Cap. 2, pp. 67-72. CAB International, Wallingford
- Cary, JW, Rajasekaran K, Jaynes JM, Cleveland TE (2000) Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth *in vitro* and in planta. Plant Sci. 154:171-181
- Chakrabarti, A, Ganapathi TR, Mukherjee PK, Bapat VA (2003) MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. Planta 216:587-596
- Chandler, S (1995) The nutritional value of banana. En: Gowen, S. (Ed.) Bananas and plantains. Chapman y Hall. London
- Chong, PB, Bermúdez CI, López J, Machado J, Portal O, Alvarado Y, Swennen R, Sagi L, Gómez KR (2004) Genetic transformation using chimeric antifungal genes. 1st. International Congress on *Musa*. Penang, Malaysia
- Cote, F, Domerque R, Monmarson S, Schwendiman J, Teisson C, Escalant J (1996) Embryogenic cell suspension from the male flower of *Musa* (AAA) cv. 'Grand naine'. Physiol. Plant. 97:285-290
- Cronauer, SS, Krikorian AD (1984) Multiplication of *Musa* from Excised Stem Tips. Annals of Botany 53: 321-328
- Crous, P, Mourichon X (2002) *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. Nov., causal agent of eumusae leaf spot disease of banana. Sydowia 54: 35-43
- De-Gray, G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H (2001) Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Physiol. 127: 852- 862
- De-Langhe, E (1996) Banana and plantain: The earliest fruit crop. INIBAP Annual Report, INIBAP. Montpellier
- De-Lucca, AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Cleveland TE, Walsh TJ (1997) Fungicidal activity of cecropin A. Antimicrobial Agents in Chemotherapy 41: 481- 483
- Drew, RA, Smith MK (1990) Field evaluation of tissue-cultured bananas in south-eastern Queensland. Australian Journal of Experimental Agriculture 30: 569-574
- El-Hadrami, A, Kone D, Lepoivre P (2005) Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to Black Leaf Streak Disease. European Journal of Plant Pathology 113: 241-254
- Escalant, JV (1989) Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell Reports 7 (8): 665-668
- Ferris, S, Vuylsteke D, Ortiz R (1994) Fruit evaluation of IITA black sigatoka resistant tetraploid plantain hybrids. Abstracts of XXIVTH International Horticultural Congress, Kyoto, Japan, 21-27 agosto de 1994
- Frison, E, Orjeda G, Sharrock S (1997) Proceedings of meeting held in Gosier, Guadeloupe. International network for the improvement of banana and plantain. Proc Natl Acad Sci USA. 82: 5824-5828
- Ganapathi, C, Srinivas L, Suprasanna P, Bapat V (2001) Regeneration of plants from alginate - encapsulated somatic embryos of bananas cv. Rasthali (*Musa* spp. AAB group). In vitro cell Dev. Plant 37: 178-181
- Ganapathi, TR, Higgs NS, Balint-Kurti PJ, Arntzen CJ, May GD, Van-Eck JM (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). Plant Cell Reports 20(2): 157-162
- Ganz, T, Lehrer RI (1994) Defensins. Cur. Opin. Immunol. 6:584-589
- García, L, Herrera IL, Bermúdez I, Veitia N, Clavelo J, Acosta M, Romero C (1997) Metodología para la selección *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en banano. INFOMUSA. 6(1):14-15

- García, L, Herrera IL, Bermúdez I, Clavero J, Bermudez I, Veitia N, Acosta SM (2004) Efecto del filtrado de cultivo de *P. fijiensis* Morelet sobre yemas adventicias de cultivares de *Musa* spp. Biotecnología vegetal 4(1):21-27
- Gauhl, F, Pasberg-Gauhl C, Vuylsteke D, Ortiz R (1993) Multilocal evaluation of black sigatoka resistance in banana and plantain. IITA Research guide 47. Ibadan, Nigeria: IITA
- Kosky, RG (1998) Cultivo de células y tejidos. En: Pérez JN (Ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp 25-44. IBP, Santa Clara
- Kosky, RG, Deferia M, Posada LP, Gilliard T, Martínez FB, Reyes MV, Chávez MM, Quijale ME (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar 'FHIA-18' (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. Plant Cell Tissue Organ Culture 68: 21-26
- Gómez, LMA, González JA, Ortiz JL, Aguilar MI, Sandoval J (2004) Logros y perspectivas de la transformación genética en banano. Publicación especial XVI Reunión Internacional ACORBAT 2004. Oaxaca. México
- Hahn, Sk, Vuylsteke D, Swennen R (1990) First reactions to ABB cooking bananas distributed in southeastern Nigeria. Proceedings of an international workshop, San José, Costa Rica, March 1989. INIBAP. Montpellier
- Hecht, BC, Borges PA, Fernandez FM y Borges AA (1998) Influence of zinc nutrition on *Fusarium* wilt of banana - an electron microscopic investigation. En: Saúco, V (ed.), Proceedings of the first international symposium on banana in the subtropics. Galán. INIBAP. Montpellier
- Hernández, R (1995) Selección *in vitro* e invernadero de clones de *Musa* sp. para la evaluación de su resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Tesis en opción del grado científico de Master en ciencia. CATIE
- Hwang, SC, Ko WH (2004) Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. Plant Disease. 88(6): 580-588
- Hwang, SC, Chao CP, Ko WH (1994) GCTCV-215-1: a promising Cavendish clone resistant to Race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Proceedings: International Symposium on recent developments in banana cultivation technology. INIBAP. Montpellier
- Hwang, SC, Chen CL, Lin JC, Lin HL (1984) Cultivation of banana using plantlets from meristem culture. Hortscience 19 (2): 231-233
- Jácóme, L (2003) Population biology and epidemiology. En: Jácóme, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R, Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. pp. 107-110. INIBAP. Montpellier
- Jain, M (2002) Informe sumario de la Cuarta Reunión final de investigaciones coordinadas de FAO/IAEA sobre la Biología celular y biotecnología incluyendo técnicas de mutación para la creación de nuevos genotipos útiles de banano. INFOMUSA. 11(1): 14-15
- Ji, C, Kué J (1996) Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. Physiol. Mol. Plant Pathol. 49:257-265
- Johanson, A (1998) Detection of banana leaf spot pathogens by PCR. Bulletin OEPP/OPPO 25: 99-107
- Jones, D (2000) Fungal disease of the foliage. En: Jones D (ed). Diseases of Banana; Abacá and Enset, pp. 48-71 CABI Publishing, Wallingford
- Jones, D (2003) The distribution and importance of *Mycosphaerella* leaf spot disease of banana. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R, Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. pp. 25-42 INIBAP. Montpellier
- Jongedijk, E, Tigelaar H, Van-Roekel JSC, Bres-Vloemans SA, Dekker I, VanDen Elzen PJM, Cornelissen BJC, Melchers L (1995) Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 85:173-180
- Keller, H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R, Verrier JL, Roby D, Ricei P (1999) Pathogen induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. Plant Cell. 11: 223- 235
- Khanna, H, Becker D, Kleidon J, Dale J (2004) Centrifugation Assisted *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (CAAT) of embryogenic cell suspensions of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady finger AAB). Molecular Breeding 14(3): 239-252
- Kim, MG, Lee KO, Cheong NE, Choi YO, Jeong JH, Cho MGJ, Kim SCH, Lee SY (1999) Molecular cloning and characterization of class III chitinase in pumpkin leaves, which strongly binds to regenerated chitin affinity gel. Plants Sci. 147:157-163
- Kodyn, A, Zapata F (1999) Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa* acuminate cv. Grande naine). Plant Cell Tissue and Organ Culture 55: 141-145
- Kristyanne, ES, Kim KS, Stewart JM (1997) Magainin 2 effects on the ultrastructure of five plant pathogens. Mycologia 89:353-360
- Lepoivre, P, Busogoro JP, Etame J, ElHadrami A, Carlier J, Harelimana G, Mourichon X, Panis B, Riveros S, Sallé G, Strosse H, Swennen R (2003) Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R, Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. pp. 151-159. INIBAP Montpellier
- Li, Q, Lawrence CB, Xing HY, Babbitt RA, Bass WT, Maiti IB, Everett NP (2001) Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analogue in transgenic tobacco. Planta 212:635-639
- Lorito, M, Woo SL, Garcia I, Collude G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F, Fernandez IG (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:7860-7865
- Ma, SS, Shii CI (1972) *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. Hort Science 19:231-233
- Maloy, WL, Karim UP (1995) Structure-activity studies on magainins and others host defense peptides. Biopolymers. 37: 105-122
- Marín, D, Romero R, Guzmán M, Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. Plant disease 87(3): 208-222
- Marín, D, Sutton T, Barrer A (2002) Diseminación del banano en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de

- Radopholus similis. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 66: 62-75
- Matsumoto, K, Luz BM, Copati-Souza LA, Batista TJ (1995) Race 1 *Fusarium* wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. Euphytica 84 (1): 67-71
- May, GD, Afza R, Mason HS, Wiecko A, Novak FJ, Artzen CJ (1995) Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. Bio/Technology 13: 486-492
- Melchers, LS, Stuiver MH (2000) Novel genes for disease. Curr. Op. Plant Biol. 3: 147-152
- Mendes, BMJ, Rodríguez BIP, Tulmann A (1993) Effect of toxic filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on the development of banana (*Musa* spp.) shoot tips. Fitopatología Brasileira 18(6):10-15
- Mendes, BMJ, Rodríguez BIP, Tulmann NA (1993) Effect of toxic filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on the development of banana (*Musa* cvs.) shoot tips. En: *In vitro* mutation breeding of bananas and plantains. Final reports of an FAO/IAEA co-ordinated research programme organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture from 1988 to 1993. pp. 31-36. FAO Roma
- Menéndez, T, Shepherd K (1975) Breeding new bananas. World Crops 104-112
- Mobambo KN, Gauhl F, Vuylsteke D, Ortiz R, Pasberg-Gauhl C, Swennen R (1993) Yield loss in plantain from black sigatoka leaf spot and field performance of resistant hybrids. Field Crops Research 35:35-42
- Mobambo, K (2002) Estrategias para el manejo integrado de la producción platanera y control de la Sigatoka negra en la República Democrática del Congo. Enfermedades. Control de la Sigatoka negra. INFOMUSA 11(1): 3-6
- Mobambo, K, Gauhl F, Vuylsteke D, Ortiz R, Pasberg-Gauhl R, Swennen R (1994) Yield loss in plantain from Black Sigatoka leaf spot and field performance of resistance hybrids. Field Crops Research 35: 35-42
- Molina, G, Krauz J (1989) Actividad fitotóxica en extracto de cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis* y su uso para evaluar patrones de resistencia a la Sigatoka negra. Plant Disease 73(2): 142-144
- Molina, GC, Krausz JP (1989) A phytotoxic activity in extracts of broth cultures of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and its use to evaluate host resistance to Black Sigatoka. Plant Disease 73: 142-144
- Mourichon, X (1995) *Mycosphaerella fijiensis*, Diversity and Possibilities for the early screening of germplasm for resistance. En: Jones, D (ed) The improvement and testing of *Musa*: A global partner ship. First Global conference of the international *Musa* testing program, pp. 47- 53 La Lima
- Mourichon, X (2003) Overview of progress and results since the first international workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease of banana in 1989. En: Jacome, L, Lepoivre, P., Marín, D., Ortiz, R., Romero, R (Eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. pp.11-18. INIBAP Montpellier
- Mourichon, X, Fullerton RA (1990) Geographical distribution of two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka Disease and Black Leaf Streak Disease in bananas and plantains. Fruits 45: 213-218
- Mourichon, X, Lepoivre P, Carlier J (2000) Host-pathogens interactions. Chapter 2. Fungal disease of the foliage. Pp. 67-72 in Diseases of Banana, Abacá and Enset. (D.R. Jones, ed.). CABI publishing, Wallingford, Oxford, UK
- Mourichon, X, Peter D, Zapater M (1987) Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur jeunes plantules de bananier issues de culture *in vitro*. Fruit 42(4):195-198
- Niderman, T, Genetet I, Buryere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Friting B, Mosinger E (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. 108: 17-27
- Novak, FJ, Afza R, Van-Duren M, Perea D, Conger MBV, Xiaolang T (1989) Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Suspension cultures of Dessert (AA and AAA) and Cooking (ABB) Bananas (*Musa* spp.) BioTechnology 7:154-159
- Okole, B, Schulz F (1997) Selection of *Mycosphaerella fijiensis*- resistant cell lines from micro-cross selection of banana and plantain. Plant cell Reports 16: 339-343
- Orellana, P (1998) Introducción a la propagación masiva. En: Pérez, P(Ed) Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. pp. 125-133. IBP. Santa Clara
- Ortiz, R, Vuylsteke D (1992) Inheritance of black sigatoka resistance and fruit parthenocarp in triploid AAB plantain. Agronomy abstracts
- Ortiz, R, Vuylsteke D (1993) The genetics of black sigatoka resistance, growth and yield parameters in 4x and 2x plantain-banana hybrids En: Ganry J (ed.) Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests, p. 379. CIRAD- INIBAP. Montpellier
- Ortiz, R, Vuylsteke D, Fouré E, Akele S, Lawrence A (1993) Stability of black sigatoka resistance in TMPX germplasm. Musafrica 3:10-11
- Ortiz, VE, Kaemmer D, Zhang HB, Muth J, Rodríguez MM, Arias CC, Andrew J (2005) Construction and characterization of a plant transformation-competent BIBAC library of the black Sigatoka-resistant banana *Musa acuminata* cv. Tuu Gia (AA). TAG Theoretical and Applied Genetics 110 (4): 706-713
- Osusky, M, Zhou G, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Mitra S (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. Nat. Biotechnol 18: 1162-1166
- Pérez, JB (2000) Development and application of *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation to increase Fungus-Resistance in Banana (*Musa* spp.). Ph. D. Thesis, K. U. Leuven, Belgium
- Pérez, L (1997) Control de Sigatoka negra en Cuba: Un enfoque de manejo integrado de la enfermedad. INFOMUSA 7(1): 26-31
- Pérez, JN, Gómez KR, Jimenez E, Orellana P (2000) Genetic improvement programa at the Institute of Plant Biotechnology. En: Arencibia AD (Ed) Plant Genetic engineering: Towards the third Millennium, pp. 107-117 La Habana
- Rajasekaran, K, Stromberg KD, Cary JW, Cleveland TE (2001) Broad-spectrum antimicrobial activity *in vitro* of the synthetic peptide D4E1. J Agric. Food Chem. 49: 2799-2803

- Rao, P, Ganapathi C, Suprasanna P y Bapat V (1993) Encapsulated shoot tips of banana: a new propagation and delivery system. *INFOMUSA* 2(2): 4-5
- Remy, S (2000) Genetic Transformation of Banana (*Musa* sp.) for disease Resistance by Expression of Antimicrobial Proteins PhD Thesis KUL, Belgium
- Remy, S, Buyens A, Cammue BP, Swennen R, Sagi L (1998) Production of transgenic banana plants expressing antifungal proteins. *Acta Hort.* 490: 433-436
- Remy, S, Thiry E, Coemans B, Windelinckx S, Swennen R, Sági L (2005) Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. *BioTechniques* 38(5):763-770
- Rezzonico, E, Flury N, Meins F, Beffa R (1998) Transcriptional down-regulation by abscisic acid pathogenesis-related α -1, 3-glucanase genes in tobacco cell culture. *Plant Physiol.* 117: 585-592
- Robinson, JC (1996) Bananas and Plantains. Crop production science in Horticulture 5, CAB International. Wallingford
- Robinson, JC, Fraser C, Eckstein K (1993) A field comparison of conventional suckers with tissue culture banana planting material over three crop cycles. *Journal of Horticultural Science* 68: 831- 836
- Rodríguez, M, Álvarez M, García G (1997) Estrategias para el mejoramiento del banano y del plátano en Cuba. *INFOMUSA* 6(1): 12-13
- Roux, N, Toloza A, Busogoro J, Panis B, Strosse H, Lepoivre P, Swennen R, Zapata F (2003) Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero, R y Escalant, V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica pp. 239-250. INIBAP Montpellier
- Rowe, P, Rosales FE (1996) Bananas and plantains. Fruit Breeding 1:167-211
- Rowe, PR, Richardson DL (1975) Breeding Bananas for disease resistance, fruit quality and yield. *Bulletin* 1: 2-5
- Sági L, Panis B, Remy S, Schoofs H, De Smet K, Swennen R, Cammue BPA (1995) Genetic transformation of banana and plantain (*Musa*) via particle bombardment. *Bio/Technology* 13:481-485
- Sagi, L, Remy S, Panis B, Swennen R, Volckaert G (1994) Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cultivar Bluggoe, ABB group) protoplast isolated from regenerable embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports.* 13: 262-266
- Segura, A, Moreno M, Molina A, Garcia-Olmedo F (1998) Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett.* 435: 159-162
- Sela-Buurlage, MB, Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Melchers LS, VanDen-Elzen PJM, Cornelissen BJC (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and α -1, 3-glucanase exhibit antifungal activity. *Plant Physiol* 101: 857-863
- Selitrannikoff, CP (2001) Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2883-2894
- Sharrock, S, Frison E (1999) *Musa* production around the world. Trends, varieties and regional importance. Focus paper No.2. Annual Report INIBAP 1998. INIBAP, Montpellier. pp 41-46
- Shepherd, K, Lacy DS (1968) Resistance of mature banana plants and seedlings to Fusarial wilt in Jamaica. First International Congress of Plant Pathology, Abstracts
- Simmonds, NW (1966) Bananas. 2 nd. Ed. Londres, UK, Logmans
- Simmonds, NW (1997) Pie in the sky. Tropical Agriculture Association Newsletter
- Simoens, C, Montagu VM (1995) Genetic engineering in plants. *Human Reproduction Update* 1: 523-542
- Smith, EF (1910) A Cuban banana disease. *Science* 31:754-755
- Smith, MK, Drew RA (1990) Current Applications of Tissue Culture in Plant propagation and improvement. *Australian Journal of Plant Physiology* 17(3): 267 – 289
- Smith, MK, Drew RA (1990) Growth and yield characteristics of dwarf off-types recovered from tissue cultured bananas. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30: 575-578
- Stover, R, Simmonds N (1987) Bananas. Harlow 3rd ed. Longman Scientific & Technical. Essex, England
- Stover, RH (1972) Banana, Plantain and Abaca Diseases. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, England
- Sun, EJ, Su HJ (1984) Rapid method for determining differential pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using banana plantlets. *Trop. Agr.* 61: 7-8
- Swennen, R, Vuylsteke D (1991) Preliminary results at IITA in breeding plantain for black sigatoka resistance in Africa. En: Anez B, Nava C, Sosa L, Jaramillo R, (eds.) Proceedings of the 9th ACORBAT meeting, Merida, Venezuela, 24-29 sep, 1989, pp. 235-244. INIBAP Montpellier
- Swennen, R, Vuylsteke D (1993) Breeding black sigatoka resistant plantains with a wild banana. *Tropical agriculture* 70:74-78
- Swennen, R, Arinaitwe G, Cammue B, Francois I, Panis B, Sági L, Santos E, Strosse H, Van-Den-Houwe, I (2003) Transgenic approaches for resistance to *Mycosphaerella* leaf spot disease in *Musa* spp. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica, pp. 209-238. INIBAP Montpellier
- Swennen, R, Vuylsteke D, Hahn Sk (1989) Combating the black sigatoka threat to plantains. *IITA research briefs* 9(2):2-4
- Swennen, R, Vuylsteke D, Ortiz R (1995) Phenotypic diversity and patterns of variation in Wets and Central African plantains (*Musa* spp; AAB group *Musaceae*). *Economic Botany* 49(3): 320-327
- Vakili, NG (1965) *Fusarium* wilt resistance in seedlings and mature plants of *Musa* species, *Phytopathology* 55: 135-140
- Ventura, J, Mener V, López J, García M, Rodríguez S, García J, Reynaldo D (1998) Manejo de los explantes en inmersión temporal, clon de banano FHIA-18. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones de la Habana. FAO. Cuba
- Veronese, P, Ruiz MT, Coca MA, Hernández LA, Lee H, Ibeas JI, Damsz B, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA, Narasimhan ML (2003). In defense against Pathogens. Both Plant Sentinels and Foot Soldiers need to know the Enemy. *Plant Physiol* 131: 1580-1590

- Vuylsteke, D (1998) Field performance of banana micropropagules and somaclones. En: SM Jain, DS Brar y BS Ahloowalia (eds). Somaclonal Variation and Induced Mutation in Crop Improvement, pp. 219-231. Kluwer Academic Publishers Dordrecht
- Vuylsteke, D, Ortiz, R, Ferris, RSB, Crouch, JH (1997) Plantain improvement. Plant Breeding Reviews 14: 267-320
- Vuylsteke, D, Ortiz R (1993) Diploid plantains with black sigatoka resistance. Musafrika 2:1-2
- Vuylsteke, D, Swennen R (1988) Preliminary report on the vigour and black sigatoka reaction of some east african bananas, cultivated under humid lowland conditions in Nigeria. Musarama 1(1):2-3
- Vuylsteke, D, Ortiz R, Swennen R (1993) Genetic improvement of plantains at IITA. En: Ganry J, (Ed.) Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests, pp. 267-282 CIRAD- INIBAP. Montpellier
- Vuylsteke, D, Ortiz R, Swennen R (1993) Genetic improvement of plantains and bananas at IITA. Infomusa 2(1):10-12
- Vuylsteke, D, Ortiz R, Swennen R (1994) Breeding plantain hybrids for resistance to black sigatoka. IITA research 8 (3): 9-14
- Vuylsteke, D, Swennen R, De-Langhe E (1990) Tissue culture technology for the improvement of african plantains. En: Fullerton RA, Stover RH (Eds.) Sigatoka leaf spot diseases of bananas: Proceedings of an international workshop, San José, Costa Rica, march 1989, pp. 316-337. INIBAP. Montpellier
- Vuylsteke, DR (1989) Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Practical manuals for handling crop germplasm *in vitro* 2. Rome
- Vuylsteke, DR, Swennen RL, De-Langhe ED (1997) Performance of Somaclonal Variants of Plantain (*Musa* spp., AAB Group). Amer Soc Hort Sci. 121:42-46
- Vuylsteke, DR, Ortiz R (1996) Field performance of conventional vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa* spp., AAB group). Hortscience 31(5): 742-762
- Xia, XF, Sui SF (2000) The membrane insertion of trichosanthin is membrane surface pH dependent. Biochemical Journal 349: 835-841
- Yun, DJ, Bressan RA, Hasegawa PM (1997) Plant antifungal proteins. Plant Breeding Rev.14: 39-88
- Yun, GP, Shi YL, Wang WP, Liu WY (1998) Cation channel formed at lipid bilayer by Cinnamomin, a new type II ribosome inactivating protein. Toxicon 37: 1313-1322
- Zasloff, M (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms and partial cDNA sequence of a precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:5449-5453